



UNIVERSIDAD DE LAMBAYEQUE

FACULTAD DE CIENCIAS DE INGENIERIA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AMBIENTAL

TESIS:

**Efecto biocida de cepas nativas de *Bacillus sp.* aisladas de humus sobre
larvas de *Anopheles sp.* obtenidas en el distrito de Motupe, 2016**

PRESENTADA PARA OPTAR EL TITULO DE INGENIERO AMBIENTAL

AUTORES:

**KAREN CRISTINA CHAVEZ PARDO
ANA STEFANI GARBOZA TORRES**

CHICLAYO, Marzo del 2018

FIRMA DEL ASESOR Y JURADOS DE TESIS

Mgtr. César Alberto Cabrejos Montalvo
ASESOR

Dr. Eduardo Julio Tejada Sánchez
PRESIDENTE

Mgtr. Marcos Guillermo Garcia Paico
SECRETARIO

Mgtr. Luis Fernando Terán Bazán
VOCAL

DEDICATORIA

A Dios por ser mi guía y mi consejero espiritual el cual siempre me ayudo en perseverar en cada momento de mi vida.

A mis padres; **Silvia Torres Huamán y Luis Alberto Garboza Díaz** por haberme forjado como persona y sobre todo confiando en cumplir mis logros en especial este.

A mis Hermanos; **Naysha Garboza Torres, Luis Garboza Torres y Angi Garboza** por acompañarme y Confiar en esta gran reto.

A mi tía; **María Estela Díaz** por sus consejos y su ayuda constantemente en cada situación de mi vida y sobre todo por su afanoso deseo de lograr mi superación

Ana Stefani Garboza Torres

DEDICATORIA

A Dios por su inmenso amor y bendición, por ser la luz y guía en mi camino.

A mis padres; **Bilma Pardo y Jesús Ríos** por el amor, comprensión y confianza que me han brindado a lo largo de mi vida, por su apoyo para realizarme como persona y cumplir mis metas

A mi abuela **Cristina Mendoza** por su amor y apoyo en cada momento de mi vida.

A mis hermanos, **Esther, Jorge, Enrique y Aymar** por su cariño y confianza.

A mis tías, **Sarita, Consuelo, Mari y Nelly Pardo** por su cariño y su apoyo para lograr mis objetivos.

Karen Cristina Chávez Pardo

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se le agradece de manera muy especial a nuestro asesor incondicional Docente de la "Universidad de Lambayeque - UDL Biólogo **Msc. Mblgo. Cesar Alberto Cabrejos Montalvo** por su Paciencia, Guía, por sus conocimientos y experiencias brindadas para la presente culminación de esta investigación.

De manera especial se le agradece a nuestro amigo **Hugo Santiago Campos Castro** por el apoyo desinteresado en la realización de los mapas de la presente investigación.

Se les agradece a todas aquellas personas que de alguna u otra manera contribuyeron al término del presente trabajo de investigación.

CONTENIDO

I. INTRODUCCION	12
II. MARCO TEORICO	14
2.1. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	14
2.2. BASES TEORICAS	18
2.2.1. Efecto biocida de cepas nativas de <i>Bacillus sp.</i>	18
2.2.1.1. Características del genero <i>Bacillus sp.</i>	18
2.2.1.2. <i>Bacillus sphaericus</i>	19
2.2.1.3. Características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas	20
2.2.1.4. Modo de acción de <i>Bacillus sp.</i>	20
2.2.1.5. Control microbial de larvas de mosquito.	23
2.2.2. Larvas de <i>Anopheles sp.</i>	24
2.2.2.1. Características de <i>Anopheles sp.</i>	24
2.2.2.2. Ciclo de vida.	24
2.2.3. Importancia médica.	27
2.2.3.1. La Malaria o Paludismo	27
2.2.3.2. Fumigación con insecticidas de acción residual	28
2.2.3.3. Resistencia a los insecticidas	29
2.2.3.4. Incidencia de la Malaria en el Perú	29
2.3. DEFINICION DE TERMINOS BASICOS.	31
2.4. HIPÓTESIS	33
III. MATERIALES Y METODOS	34
3.1. TIPO DE ESTUDIO Y DISEÑO DE INVESTIGACION	34
3.2. POBLACION Y MUESTRA EN ESTUDIO	34
3.3. METODOS, TECNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCION DE DATOS.	35
3.3.1. Metodología para Aislamiento de <i>Bacillus sp.</i>	35
3.3.2. Selección de <i>Bacillus sp</i> en base a su potencial biocida frente a larvas de <i>Anopheles sp.</i>	35
3.3.3. Instrumento	37
3.4. PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANALISIS ESTADISTICOS.	37
IV. RESULTADOS.	38
4.1. Aislamiento e identificación de cepas nativas de <i>Bacillus sp.</i> aisladas de Humus	38
4.2. Obtener e identificar larvas de <i>Anopheles sp.</i> en el distrito de Motupe	39

4.3. Evaluación de efecto biocida de las cepas nativas de <i>Bacillus sp.</i> sobre las larvas de <i>Anopheles sp.</i>	40
V. DISCUSION	43
VI. CONCLUSIONES	45
VII. RECOMENDACIONES	46
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	47
IX. ANEXOS	50

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Lista de cotejo del grupo control, que se usó para una comparación con el grupo experimental	41
Tabla 2: Lista de cotejo del grupo experimental, donde se evaluó la mortalidad de las larvas de Anopheles sp. a diferentes concentraciones y tiempos de exposición.	42
Tabla 3: Formato de la lista de cotejo usada para apuntar la mortalidad de las larvas de Anopheles en los diferentes tiempos de 24, 48, 72 horas	56
Tabla 4: Casos de Malaria (Vivax +Falciparum) según departamentos Perú años 2004 – 2016 y 2017.....	59
Tabla 5: Incidencia de Malaria en los distritos del departamento de Lambayeque ...	60

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Se aisló la bacteria de <i>Bacillus</i> sp.	38
Figura 2: Se Identificó las colonias de cepas <i>Bacillus</i> sp.	38
Figura 3: Identificación de la larva de <i>Anopheles</i> sp.	39
Figura 4: Larvas de <i>Anopheles</i> sp. observadas en el microscopio.	40
Figura 5: Mapa de ubicación del caserío El Salitral, distrito de Motupe, Provincia de Lambayeque, departamento de Lambayeque, lugar donde se obtuvo las muestras de larvas de II estadio.	51
Figura 6: Criaderos de larvas de <i>Anopheles</i> sp.	52
Figura 7: Recolección de muestras de <i>Anopheles</i> sp.	53
Figura 8: Aplicación de las cepas de <i>Bacillus</i> sp. en caldo peptonado, formando el inóculo que posteriormente se aplicó a las muestras de larvas de <i>Anopheles</i> sp.	54
Figura 9: Aplicación del inóculo a las larvas de <i>Anopheles</i> sp.	55
Figura 10: Muestras de larvas de <i>Anopheles</i> sp.	55
Figura 11: Bioensayos.	56
Figura 12: Esquema de la contrastación de hipótesis.	57
Figura 13: Incidencia de la Malaria por departamentos en el Perú	58

Resumen

El objetivo principal de este trabajo es evaluar el efecto biocida de cepas nativas de *Bacillus sp* aisladas de humus en diferentes concentraciones y tiempo de exposición, sobre larvas de *Anopheles sp.* obtenidas en el distrito de Motupe. Para ello el problema de investigación quedo planteado de la siguiente manera ¿Cuál será el efecto biocida de cepas nativas de *Bacillus sp.* a diferentes concentraciones y tiempo de exposición, sobre larvas de *Anopheles sp.*? y la hipótesis planteo que las cepas nativas de *Bacillus sp* tienen efecto biocida a diferentes concentraciones y tiempos de exposición, sobre larvas de *Anopheles sp.* La metodología de investigación es de tipo experimental, con diseño de estímulo creciente, teniendo un grupo control y un grupo experimental. Se tuvo como muestra 200 larvas que fueron divididas en 5 grupos de 20 larvas cada uno, para la posterior aplicación a diferentes concentraciones de la bacteria *Bacillus sp.*, que fueron evaluadas mediante una lista de cotejo y observación directa. Finalmente se tuvo como resultados una mortalidad del 82% en un tiempo de exposición de 72 horas, donde el tubo n°8 con una concentración de 2.4×10^9 tuvo una mayor eficacia resultando esta la ideal. Por lo tanto se concluyó que las cepas de *Bacillus sp.* si tienen efecto biocida sobre las larvas de *Anopheles sp.*

Palabras claves: efecto Biocida, *Anopheles sp.*, *Bacillus sp.*

ABSTRACT

The main objective for this research is to evaluate the biocide effect of native *Bacillus sp.* strains isolated from Hummus in different concentration and exposure time on *Anopheles sp.* larvae obtained in the Motupe district. For that reason, the investigation problem was raised as followed: What will the biocide effect of native *Bacillus sp.* strains at different concentration and exposure time on *Anopheles sp.* larvae be? The research methodology is the experimental type with growing stimulus design having a control group and an experimental group. 200 larvae were sampled, divided into 5 groups of 20 larvae each for the posterior application at different concentrations of *Bacillus sp.* bacteria that were evaluated through a checklist and direct observations. Finally, we ended with the results of 67% death in a 72 hour period at exposure where tube N 8 with a concentration of 2.4×10^9 had a major efficiency resulting ideal. Finally, we ended with the results of 82% death in a 72 hour period at exposure where tube N 8 with a concentration of 2.4×10^9 had a major efficiency resulting ideal. Therefore we came to the conclusion that the *Bacillus sp.* strains do have a biocide effect on *Anopheles sp.* larvae.

Keywords: Biocide effect; *Anopheles sp.*; *Bacillus sp.*

I. INTRODUCCION

La contaminación del medio ambiente a través de los años se ha ido incrementando de manera exponencial en diversas partes del mundo, de manera natural y antrópica. Uno de estos problemas es la contaminación por residuos químicos de los insecticidas con efecto residual, que son utilizados como controladores para vectores como *Anopheles sp.* que transmiten la Malaria o Paludismo. Esta enfermedad tiene mayor impacto en las regiones de África, sureste Asiático y América (**Organizacion Mundial de la Salud, 2017**)

Asimismo en Lambayeque, los distritos con mayor incidencia de Malaria son Motupe, Olmos, Jayanca, Salas, Pitipo, Chongoyape. (Rivas & Zamora, 2014). A raíz de estas problemáticas el Perú se ha visto en la necesidad de buscar nuevos métodos para contrarrestar esta contaminación ambiental y prevenir la propagación de enfermedades metaxénicas. (**Ministerio del Ambiente, 2016**)

Se han realizado intentos para establecer un sistema de vigilancia para el control de vectores. Entre los años 1959 y 1962, Acosta y colaboradores comprobaron la sensibilidad del *Anopheles sp.* a los organoclorados, DDT y Dieldrin, insecticidas usados en esa época para la erradicación del Paludismo. Sin embargo estudios recientes han encontrado Resistencia de *Anopheles sp.* a insecticidas compuestos por piretroides, carbamatos y a DDT. (**Ministerio de Salud, 2008**)

En la búsqueda por nuevos métodos biológicos para el control larval se utilizó el control biológico siendo definido como el uso de microorganismos o sus productos para el control de plagas. El género *Bacillus sp* son bacterias con más aplicación y éxito que han tenido debido a su actividad toxica, casi exclusiva sobre larvas del genero *Culicidae*, gracias a su composición y principalmente a la presencia de esporas en la bacteria que contiene un cristal tóxico que al ser

ingerido por las larvas de *Anopheles sp.* actúa como un insecticida. (Gonzales, 2006)

Ante la problemática expuesta se formuló el siguiente problema de investigación: ¿Cuál será el efecto biocida de cepas nativas de *Bacillus sp* a diferentes concentraciones y tiempo de exposición de 24, 48 y 72 horas sobre larvas de *Anopheles sp*?; por lo cual se propuso el siguiente objetivo general:

Evaluar el efecto biocida de cepas nativas de *Bacillus sp* aisladas de humus, en diferentes concentraciones y tiempos de exposición, sobre larvas de *Anopheles sp.* obtenidas en el distrito de Motupe 2016; asimismo se tuvo los siguientes objetivos específicos:

Aislar e identificar cepas nativas de *Bacillus sp* a partir de humus; obtener e identificar larvas de *Anopheles sp.* en el distrito de Motupe; Evaluar el efecto biocida de cepas nativas de *Bacillus sp* a partir de concentraciones de $1,8 \times 10^9$, $2,1 \times 10^9$, $2,4 \times 10^9$, $2,7 \times 10^9$, $3,0 \times 10^9$, a tiempos de exposiciones de 24, 48 y 72 horas, sobre larvas de *Anopheles sp.*

II. MARCO TEORICO

2.1. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

Nuviola et al. (2017) comprobó la efectividad en La Habana de Bactivec (*Bacillus thuringiensis*) and Griselesf (*Bacillus sphaericus*). En la cual se utilizó dosis (Bactivec 2mL/m²; Griselesf 5mL/m²); La aplicación se realizó con aspersores manuales y en ocasiones con motomochilas de 10L de capacidad de acuerdo con lo establecido por las normas del programa de control de malaria en Angola.

La utilización de la mezcla de ambos biolarvicidas a la vez fue decisión de los directivos del Programa de Malaria de Angola. En cada sitio de cría se aplicó con una frecuencia mensual durante 5 meses donde el porcentaje de sitios de cría con larvas 21 días después de la aplicación varió entre el 39,2 % y el 43 % durante los meses que duró la investigación, con un incremento entre el 50,4 % y el 78,1 % a los 30 días. La efectividad de los tratamientos a las 24 y 48 h después de la aplicación osciló entre el 98 % y el 100 % del *Anopheles sp.*

Para contribuir el control vectorial de las larvas de *Anopheles sp* **Vargas et al. (2010)** propuso el control con *Bacillus thuringiensis H-14 var. Israelensis* en Trujillo en la cual se utilizaron 7 grupos: 6 experimentales y 1 control. Cada grupo conteniendo 20 larvas de *Anopheles sp*, respectivamente. Las concentraciones fueron tomadas de tablas estandarizadas DDT dando resultado la mortalidad de 20% a las 24h, 55% a las 48 y 70% en las 72h. Así mismo **Castro et al. (2015)** en Piura quien utilizó 25 larvas cristales tóxicos categoría IV, con CL50 de 0,0691 mg de esporas/L y CL90 de 0,15058 mg de esporas/L, realizó las lecturas de mortalidad de las larvas que fueron a las 24, 48 y 72 horas, alcanzando a las 48 horas una efectividad del 90%.

Williams & Pinto (2012) de acuerdo a las investigaciones el tipo de cuerpo de agua adecuado para el desarrollo de larvas de mosquitos hábitat larvario o criadero, varía grandemente entre especies de mosquitos e incluso dentro de la misma especie. Algunas especies prefieren los cuerpos de agua con sombra, mientras que otras prefieren hábitats soleados. Algunas especies buscan cuerpos de agua de carácter más permanente p. ej. Drenajes, tanques de agua, canales de riego y otras ocupan charcos temporales. En el continente Americano, las larvas de *Anopheles darlingi* se encuentran principalmente en los márgenes sombreados de arroyos y lagunas de aguas transparentes y fondos lodosos, con vegetación emergente o flotante.

Zabaleta (2009) Propuso en Trujillo la realización de los bioensayos de toxicidad en donde se utilizó 525 larvas de *Aedes aegypti* del III estadio, repartidos en 21 vasos de teknopor, cada vaso contenía 25 larvas y 100 mL de agua destilada. En la cual se formó 7 grupos experimentales, de los cuales 6 fueron sometidos a las diferentes concentraciones y uno fue el grupo control, se trabajó por triplicado. A los grupos experimentales se le aplicó el *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* cultivado en un medio utilizando a la sanguaza. Las concentraciones fueron de: (G1: 0 mL, G2: 670 esp/mL, G3: 1683 esp/mL, G4: 4227 esp/mL, G5: 10619 esp/mL, G6: 26673 esp/mL y G7: 67000 esp/mL). A todos los grupos experimentales estuvieron en las mismas condiciones ambientales, las lecturas fueron realizadas después de las 2, 4, 8, 12 y 24, 48 horas de exposición, alcanzando a las 48 horas una efectividad de 90% de las larvas muertas las cuales no presentan movimiento y tomaron un color negruzco.

Ventura (2004) en el distrito de Olmos, Lambayeque, propuso Cultivar e inducir la síntesis de cristal de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis* (Bti). En agar infusión de papa que permitió obtener la producción de Bti donde el estudio comprendió en trabajar con larvas del estadio II *Anopheles pseudopunctipennis* y estadio III *Aedes aegypti* donde se utilizó cinco concentraciones de la bacteria (Bti) de 3×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3.7×10^7 , 1×10^8 esporas y cristales/mL, en cinco tiempos 2, 4, 8, 12 y 24 h, mostrando alta

efectividad con la concentración de 1×10^8 a tiempos de exposición 24 horas el cual tuvo un 51% de efectividad en *Aedes aegypti* y un 100% *Anopheles pseudopunctipennis*.

Novoa & Pacherres (2003) Se desarrolló esta investigación en la provincia de Sullana, Piura, donde se utilizó 20 muestras de fango de criaderos de *Anopheles spp*, las que contendrían *Bacillus spp*, para determinar su patogenicidad sobre larvas del III estadio de *A. pseudopunctipennis* en condiciones a nivel de laboratorio, a concentraciones de 1.8×10^9 a tiempos de 24, 48, 72 h tuvo como resultados la mortalidad de larvas al 100% a las 72 horas.

Bertí (2002) se desarrolló esta investigación en Venezuela donde las muestras fueron recolectadas en los criaderos típicos de esta especie como humedales semi-permanentes con vegetación herbácea (*Eleocharis mutata*). En condiciones de campo se evaluaron dos (2) dosis comerciales (2 g/m² y 3 g/m²) de una formulación granulada (Vectolex CG 7.5%) de *Bacillus sphaericus*. Esta formulación produjo muy buen control de las poblaciones larvarias de *An. aquasalis*; las dos dosis presentaron un efecto similar contra estas larvas en los habitats expuestos a pleno sol, de pH relativamente ácido y abundante vegetación emergente; llegando a producir un porcentaje de reducción larvaria mayor del 91% durante 7 días post-tratamiento (2 g/m² y 3 g/m²); igual al 94 % durante 14 días post-tratamiento (3 g/m²) e igual o mayor del 66 % a los 21 días post-tratamiento (2 g/m² y 3 g/m²).

La efectividad de *Bacillus thuringiensis* 14 var según **Roldan et al. (2002)** en distrito de Laredo, Trujillo, demostró que la producción de esporas y cristales sobre las larvas de *Anopheles sp* en tres criaderos naturales a una concentración de $1.10 \times 10^7 - 10^8$ encontrando una reducción larvaria de 71% y 87% a diferencia de **Vargas et al. (2002)** en Trujillo en la cual propuso la infusión del medio de cultivo de *Asparagus officinalis* el *Bacillus thuringiensis* creció, en el cual tuvo una alta efectividad para controlar las larvas *Anopheles sp.* a una concentración letal (cl₅₀) de 24913 y 178562 esporas y cristales /mL.

con un tiempo letal de (Lt 50)y (Lt 90) y tiempo de 5y 7 horas demostrándose hasta 100%de mortalidad en condiciones de laboratorio.

Gonzales (2000) trabajó en estanques artificiales del campo agrícola experimental nuevo león, México en donde utilizo las larvas de *Anopheles pseudopunctipennis* colectadas para el presente estudio en la cual utilizo cuatro tratamientos con cinco repeticiones para comprobar su efectividad, Posteriormente fueron incluidas 20 larvas de tercer y cuarto estadio de utilizando la dosis recomendada por el formulador de 1 briquet por 25 pies cuadrados

Zavaleta (2000) Probó la efectividad en Trujillo de *Bacillus thuringiensis* a concentraciones de 670 esporas/ml.;1683esp/l;4227esp/ml; 10619 esp/ml; 26673esp/ml y 67000 esp/ml sobre los cuatro estadios larvas de *Anopheles pseudopunctipennis* y el cual reporto un efecto letal mayor al 95% para larvas de III estadio a la concentración en un lapso de tiempo de 12 horas; a diferencia a lo propuesto por **Castro et al. (2002)** evaluar la susceptibilidad a nivel de laboratorio del III y IV estadio de *Anopheles pseudopunctipennis* en el cual utilizo *Bacillus sphaericus* cepa 2362 a diferentes concentraciones de 0.5 ,1.0,1.5,y 2.0% reportando una efectividad de 75% a las 48 horas .

2.2. BASES TEORICAS

2.2.1. Efecto biocida de cepas nativas de *Bacillus sp.*

2.2.1.1. Características del genero *Bacillus sp.*

El género de *Bacillus sp.* agrupa *Bacillus* rectos Gram positivos, formadores de esporas muy resistentes a condiciones adversas, que tienen flagelos peritricos y son aerobios o anaerobios facultativos y catalasa positivo. Su esporulación no se reprime por la presencia de aire. Son bacterias muy ubicuas en la naturaleza, con gran variedad de nichos ecológicos, lo que refleja la gran heterogeneidad del género. La mayoría de las especies son saprofitas y están ampliamente difundidas en el suelo, agua y plantas. Algunas son capaces de sobrevivir y crecer en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad. Por esta razón a veces se aísla de ambientes tan diferentes como el suelo del ártico, fuentes termales o sedimentos marinos. **(Marquez, 2007)**

Algunas especies del género tienen aplicaciones industriales, pues son productos de antibióticos como polinixina y bacitracina o se utiliza para obtener vitaminas, alcoholes y enzimas. Otras se emplean para determinar la efectividad de procesos de esterilización. El microorganismo más importante del género es *Bacillus anthracis* que es un patógeno estricto para los animales y el hombre. **(Huerta, 2013).**

Algunas especies fundamentalmente *Bacillus cereus* están implicadas en infecciones alimentarias o infecciones de carácter oportunistas. Otras solamente son patógenas para los animales. Este género se encuentra comúnmente en suelos y plantas donde tienen un papel importante en ciclo del carbono y el nitrógeno. Son habitantes comunes de aguas frescas y estancadas, son particularmente activos en sedimentos. **(Sánchez et al., 2014)**

2.2.1.2. *Bacillus sphaericus*

Es un bacilo Gram positivo, aerobio estricto incapaz de utilizar azúcares para su crecimiento, en Agar Nutritivo crece en diferentes formas compactas difundiéndose en el medio. Algunas especies producen colonias rosa, se aísla a partir de sedimentos de río, sedimento marino y algunos alimentos. Algunas cepas son reconocidas por su patogenicidad contra larvas y mosquitos. Presenta variedad de inclusiones las cuales son cuerpos elípticos que no cambian en apariencia en el paso del intestino a la larva. Los mosquitos ingieren las bacterias y la toxina altera el funcionamiento del intestino del mosquito, es bio-controlador de larvas de *Anopheles Psudopunctipennis* y *Culex Quinquefasciatus*. Este organismo es utilizado como insecticida biológico y es efectiva de una a cuatro semanas después de la aplicación. Es utilizado como patrón de las macromoléculas biológicas tales como enzimas, proteínas de los receptores o ácidos nucleídos y estabilización térmica de los lípidos basados en estructuras, como la membrana. **(Cuervo, 2010).**

La especie de *Bacillus sphaericus*, descrita por primera vez en 1904 por Neide y Meyer, quienes descubrieron una bacteria formadora de esporas, que existe en la naturaleza y que crece fácilmente tanto in vitro como en el cadáver de las larvas. Su actividad larvicida se debe a la producción de una inclusión cristalina denominada toxina binaria A y B de 41,9 y 51,4 kDa, respectivamente, las cuales, al ser liberadas en el intestino de los insectos susceptibles en su fase larvaria y tras ser solubilizada por el pH alcalino en la porción media del intestino, activan las proteasas causando deshidratación y muerte a los vectores. Es considerada como un biolarvicida altamente potencial y eficaz para el control biológico de *Anopheles spp.*, *Aedes spp.* y *Culex spp.* **(Cuervo, 2010)**

2.2.1.3. Características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas

Bacillus sphaericus es un bacilo Gram-positivo que mide 0.61 a 1 micra de ancho y 1.5 a 5 micras de largo, con bordes redondeados, posee una espora terminal (producida en condiciones adversas) que deforma el bacilo, dándole un aspecto de raqueta; macroscópicamente puede observarse que produce colonias beta hemolíticas, color blanco crema traslucido y bordes regulares. Este microorganismo tiene metabolismo aerobio, se desarrolla en amplios rangos de temperatura: máxima entre 30°C y 45°C y mínima de 5°C a 15°C, es catalasa positiva, no fermenta la glucosa, no reduce nitratos, es fenilalanina positivo. Sensible a bajas concentraciones de penicilina y tetraciclina y presenta resistencia al cloramfenicol y a la estreptomicina. **(Gómez et al., 2009)**

2.2.1.4. Modo de acción de *Bacillus sp.*

La bacteria *Bacillus* actúa como un veneno de tipo estomacal necesitando ser ingerido para activarse por medio de las enzimas proteasas del intestino medio, lo cual provocan una inhibición de la alimentación debido al hinchamiento, revestimiento de las células epiteliales y las alteraciones de las mitocondrias, muriendo el insecto por inanición, 5-endotoxinas presentes en la bacteria son quienes presentan la actividad tóxica, actuando de manera estomacal por lo que deben ser ingeridas por el organismo blanco para ejercer su efecto tóxico, los cuales comienzan a observarse desde un minuto después de la administración de las 5- endotoxinas .

Posterior a la ingestión de los cristales y las esporas, los primeros son solubilizados en el intestino medio del insecto, existiendo por lo menos cuatro puentes salinos que estabiliza dicha estructura, lo que explicaría las propiedades solubles de la toxina, la cual se disuelve tanto a pH ácido (3.9 a 4.2), como a pH alcalino (9.5 a 11.3). **(Gonzales, 2006)**

- **Inclusión cristalina**

En las primeras fases del proceso de esporulación el *Bacillus sphaericus* produce un cristal que contiene una proteína con gran poder tóxico frente a las larvas de mosquitos. Esta proteína es considerada como un biolarvícida altamente eficaz para el control biológico de *Anopheles spp.*, *Aedes spp* y *Culex spp*, que se compone de dos polipéptidos codificados por separado: BinA (41,9 kDa) y BinB (51,4 kDa).

Las proteínas de la toxina binaria son sintetizadas en cantidades equimolares, durante las fases tempranas de la esporulación, formando las inclusiones cristalinas en la paraespora y es codificada por dos genes (Bin A y Bin B), que han sido clonados y secuenciados del material genético, como polipéptidos que se requieren para ejercer el efecto tóxico.

Esta toxina presenta diferentes rangos de especificidad de acuerdo al hospedero, ya que es principalmente tóxica para las larvas de *Culex spp* y *Anopheles spp* y en menor potencia para *Aedes spp*. La existencia de cepas con mayor o menor toxicidad está relacionada con la expresión genética de las proteínas que conforman la toxina. Se ha demostrado que BinB es el componente primario obligatorio que actúa como ligando, dirige y localiza a BinA en las células blanco. En el caso de *Culex spp*. BinB – BinA juegan un papel importante de unión al receptor para ligarse a las células intestinales, el proceso que sigue es la internalización de la toxina en la célula intestinal. Cuando las larvas de mosquitos ingieren las esporas y los cristales proteicos, éstos se disuelven en medio alcalino, con la ocurrencia de proteólisis, liberándose en el medio fragmentos tóxicos que son reconocidos por receptores específicos que se encuentran en las células epiteliales del intestino, lo que induce a la formación de poros en las membranas de la porción distal de las microvellosidades de la mucosa del ciego y del intestino medio.

Esta unión y la acción de la toxina, además provocan en la membrana de estas células cambios concomitantes en los organelos citoplasmáticos que incluyen la desintegración del retículo endoplasmático, condensación y

tumefacción de las mitocondrias y dilatación del espacio peri nuclear. Como consecuencia de lo anterior ocurre hipertrofia y ruptura de las células del intestino medio y ciego, un desbalance iónico que lleva a toxemia y bacteremia cuyo resultado es la muerte de la larva. **(Gómez et al., 2009)**

- **Aplicación**

El *Bacillus sphaericus* se aplica típicamente a aguas con alto contenido orgánico donde viven las larvas de los mosquitos. Este microorganismo tiene el beneficio de presentar mayor persistencia en el ambiente, debido a su capacidad de reciclarse, reproducirse en los cadáveres de las larvas afectadas e infectar otras. Su uso no se permite en los depósitos que contienen agua potable ya que este microorganismo tiene eficacia en aguas ricas en materia orgánica. Las esporas de *Bacillus sphaericus* sobreviven bien en la naturaleza y parece que el reciclado ocurre en el suelo.

Estudios de la acción larvicida de las muestras ha demostrado que las de mayor profundidad tienen mayor actividad que las superficiales, ya que no se observa actividad larvicida después de una exposición a la luz directa y en hábitats con poca actividad luminosa dan resultados residuales por más largo tiempo. Su acción patógena depende de factores como: dosis de aplicación, ingestión de la toxina por la larva, velocidad de alimentación de la larva, rapidez con la cual la bacteria cae al fondo del criadero y se vuelve inaccesible a los anofelinos, competencia con otras materias orgánicas, grado de contaminación del agua, presencia o ausencia de vegetación y de los hábitos alimentarios de los vectores. Ensayos de campo han demostrado la ausencia de efectos sobre invertebrados no blanco de este microorganismo como crustáceos, dípteros, langostinos, renacuajos, escarabajos, mosca de la fruta, mosca negra, polilla de harina, al igual que vertebrados presentes en lugares de aplicación de este biolarvicida. **(Gómez et al., 2009)**

2.2.1.5. Control microbioal de larvas de mosquito.

El uso de microorganismos y/o sus productos para el control de aquellos insectos que afectan ya sea de manera directa o indirecta al hombre es lo que se puede definir como Control Microbial. En la naturaleza estos microorganismos infectan y causan epizootias en poblaciones naturales de los mosquitos, lo cual ayuda a su regulación natural. Actualmente se conocen más de 100,000 especies de microorganismos, destacándose como entomopatógenos alrededor de 750 especies de hongos, 700 de virus, 300 de protozoarios y cerca de 100 de bacterias; sin embargo, la mayoría son poco conocidas, solo algunas como *Bacillus* y sus serotipos, así como los virus han sido estudiadas detalladamente.

A los entomopatógenos se les puede dividir en dos grupos de acuerdo a su velocidad de acción, encontrando a los patógenos de daño rápido que incluyen aquellos que producen toxinas, otros que causan una septicemia bacteriana provocando la muerte al hospedero directa o indirectamente, cesando su alimentación en 24 hrs. En cuanto a los patógenos de acción lenta, debilitan al organismo blanco después de 24 hrs. siendo en ambos casos la persistencia y virulencia lo que nos dará un mejor control de los organismos.

Algunos de estos patógenos han sido desarrollados como insecticidas microbiales (*B. thuringiensis*, *B. sphaericus* y *B. papillae*) y están disponibles en formulaciones comerciales, destacando *B. thuringiensis* como el microorganismo mayor comercializado, presentando un alto grado de especificidad sobre la especie a controlar o bien por algún un estadio de vida específico, permitiendo que no sean afectados las entomofauna coexistente en los hábitats de la especie blanco entre los que se encuentra las especies que pudieran actuar al mismo tiempo como depredadores o parasitoides de dichos insectos considerados plaga ayudando a la reducción de las poblaciones junto con los patógenos; sin embargo, su acción es lenta en comparación de los insecticidas convencionales, ya que su eficacia depende de diferentes factores ambientales tales como luz solar, precipitaciones, pH, etc. **(Gonzales, 2006)**

2.2.2. Larvas de *Anopheles* sp.

2.2.2.1. Características de *Anopheles* sp.

Es un género de mosquito de la familia *Culicidae* de apenas 1cm de largo habita en prácticamente todo el mundo incluyendo Europa, África, Asia, América y Oceanía, con especial intensidad en las zonas templadas, tropicales y subtropicales y su picadura es la causante de la malaria.

Los lugares escogidos como criaderos de larvas de *Anopheles* pueden variar mucho de especie a especie, pero generalmente prefieren cuerpos de agua con vegetación emergente como: arrozales, pozas, cursos lentos de riachuelos o drenes, etc. Sean permanentes o temporales, inclusive los huecos de los árboles. Los *Anophelinos* son activos desde que se oculta el sol hasta el amanecer, cada especie tiene un pico de actividad nocturna, que varía según la especie. Su comportamiento está relacionado con la búsqueda de alimentación sanguínea, pues en medida de que prefiera sangre humana (antropofílica), será un vector más efectivo. **(Dirección General de Salud Ambiental, 2016).**

2.2.2.2. Ciclo de vida.

El mosquito *Anopheles* atraviesa cuatro fases: huevo, larva, pupa y adulto. Las primeras 3 etapas transcurren en medio acuático y se prolongan entre 5 y 14 días, según la especie y los factores ambientales como la temperatura. Es en la etapa adulta y sólo en el caso de las hembras, en la que el mosquito actúa de vector de la malaria. Las hembras adultas pueden vivir hasta un mes (algo más en cautividad), siendo lo natural no pasar de las 2 semanas de vida. **(Agencia para el Desarrollo Internacional de los Estados Unidos de América, 2012)**

- **Huevos**

Las hembras adultas de *Anopheles* copulan una vez y continúan poniendo huevos a lo largo de su vida, realizan una ingesta sanguínea cada dos o tres días. La hembra pone una tanda de huevos antes de la siguiente ingesta de sangre. Depositán sus huevos aisladamente en tandas de 50 a 200 huevos,

estos presentan unas estructuras llamadas flotadores en los extremos laterales.
(Departamento de Entomología, 2013)

- **Larvas**

Las larvas de mosquito poseen una cabeza desarrollada y prominente de la que nacen una especie de bigotes que utilizan para alimentarse; y el tórax y el abdomen (sin patas). A diferencia de muchos otros mosquitos, las larvas de *Anopheles* no disponen de un sifón respiratorio, y es por ello por lo que necesitan tener el cuerpo paralelo a la superficie del agua. Las larvas respiran a través de espiráculos situados en el octavo segmento abdominal. Dado que necesitan respirar con asiduidad, periódicamente ascienden a la superficie. Debido a esta falta de sifón respiratorio basta con agregar al agua una película fina de aceite no miscible para exterminar una población larva del insecto en esa fase de su vida. Las larvas se alimentan de algas, bacterias y otros microorganismos de la superficie. Sólo ocasionalmente descienden al fondo. Para bucear se emplean de movimientos bruscos o espasmódicos, o bien utilizan sus bigotes bucales como propulsores.

Hay cuatro etapas en el desarrollo de larva, conocidos como instares, el desarrollo de larva a pupa tarda cerca de 5-10 días en temperaturas tropicales normales, dependiendo de la especie. La temperatura del agua afecta el tiempo necesario para el desarrollo, el cual es más corto en aguas más cálidas.
(Agencia para el Desarrollo Internacional de los Estados Unidos de América, 2012).

- **Pupas**

La pupa tiene la forma de una coma y permanece en la superficie del agua. Tiene un par de trompetas respiratorias a través de las cuales respira cuando está en la superficie. No se alimenta durante este estadio, pero la pupa es móvil y responde a los estímulos. Esta es la fase de reposo o inactividad durante la cual ocurre una gran transformación de vivir en el agua para emerger a vivir fuera del agua. La etapa de pupa dura unos 2-5 días.

La cabeza y el tórax se funden en un cefalotórax y el abdomen se curva bajo éste. Periódicamente ascienden a la superficie para respirar, gracias a los órganos que disponen en el cefalotórax. Tras unos días de metamorfosis, la parte dorsal del cefalotórax se quiebra y por él surge el mosquito adulto. **(Agencia para el Desarrollo Internacional de los Estados Unidos de América, 2012)**

- **Adultos**

El adulto usualmente emerge de la pupa al atardecer. Después de emerger de la pupa, el mosquito adulto reposa por un corto período de tiempo con el fin de endurecer su cuerpo. Los mosquitos se aparean poco después de emerger. Al atardecer los machos forman grandes enjambres, y las hembras vuelan dentro de los enjambres para aparearse. Tanto los mosquitos machos como las hembras se alimentan de néctar para obtener energía. Después de aparearse, los mosquitos hembra salen en búsqueda una ingesta sanguínea, necesaria para el desarrollo de sus huevos. Para algunas especies una alimentación es suficiente para desarrollar los huevos. En otras especies se requieren dos alimentaciones, al menos para el desarrollo de la primera tanda de huevos. El tiempo que transcurre en *Anopheles* de huevo a adulto puede variar entre 7 días a 31°C y 20 días a 20°C. **(Agencia para el Desarrollo Internacional de los Estados Unidos de América, 2012)**

2.2.3. Importancia médica.

2.2.3.1. La Malaria o Paludismo

La malaria o paludismo es una enfermedad producida por un grupo de parásitos de la sangre, protozoos del género *Plasmodium*, transmitidos por la picadura de mosquitos del género *Anopheles sp.*, que se crían en una gran variedad de aguas superficiales. Los parásitos requieren, para desarrollarse en el mosquito, una temperatura superior a los 16 °C; por ello en climas tropicales su ciclo puede ser continuo, mientras que en climas templados la transmisión es estacional.

La malaria se manifiesta principalmente con fiebres intermitentes, dolores de cabeza y musculares, diarrea y decaimiento. Hay cuatro especies de parásitos humanos que producen la enfermedad: *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax* y *Plasmodium ovale* y *Plasmodium falciparum* las «tercianas graves» que pueden producir la muerte por anemia grave, daño cerebral o insuficiencia renal. (Nájera *et al.*, 2009)

El paludismo se transmite en la mayoría de los casos por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles*. En el mundo hay más de 400 especies de *Anopheles*, pero solo 30 de ellas son vectores importantes del paludismo. Todas las especies que son vectores importantes pican entre el anochecer y el amanecer. La intensidad de la transmisión depende de factores relacionados con el parásito, el vector, el huésped humano y el medio ambiente.

La transmisión es más intensa en lugares donde los mosquitos tienen una vida relativamente larga que permite que el parásito tenga tiempo para completar su desarrollo en el interior de su organismo, y cuando el vector prefiere picar al ser humano antes que a otros animales. Por ejemplo, la larga vida y la marcada preferencia por los humanos que presentan las especies que actúan como vectores en África son la principal causa de que más del 90% de los casos de paludismo se registren en ese continente. La transmisión también depende de condiciones climáticas que pueden modificar el número y la supervivencia de los

mosquitos, como el régimen de lluvias, la temperatura y la humedad. En muchos lugares la transmisión es estacional y alcanza su máxima intensidad durante la estación lluviosa e inmediatamente después. **(Organización Mundial de la Salud, 2017)**

2.2.3.2. Fumigación con insecticidas de acción residual

Primavera Silenciosa (1962), de la bióloga marina y zoóloga estadounidense Rachel Carson, denunció los efectos nocivos que para la naturaleza tenía el empleo masivo de productos químicos como los pesticidas, el DDT en particular. Se trata, por consiguiente, de un libro de ciencia que va más allá del universo científico para adentrarse en el turbulento mundo de "lo social". Su trascendencia fue tal que hoy está considerado uno de los principales responsables de la aparición de los movimientos ecologistas a favor de la conservación de la naturaleza.

En el Perú se han realizado intentos para establecer un sistema de vigilancia de la resistencia de vectores, la cual funcionó de manera sistemática en los años de la “Estrategia de erradicación de la Malaria”, pero posteriormente fue abandonado. Sin embargo, existen esfuerzos realizados por diferentes instituciones para obtener información sobre la resistencia de los distintos vectores de enfermedades metaxénicas. Entre los años 1959 y 1962, Acosta y colaboradores comprobaron la sensibilidad del mosquito *Anopheles sp.* a los organoclorados, DDT y Dieldrin, insecticidas usados en esa época para la erradicación de la Malaria. Estudios recientes han encontrado Resistencia de *Anopheles sp.* a insecticidas piretroides, carbamatos y a DDT. **(Ministerio de salud, 2008)**

La fumigación de interiores con insecticidas de acción residual (FIAR) es una intervención potente que reduce en poco tiempo la transmisión del paludismo. Su eficacia se obtiene cuando se fumiga al menos el 80% de las casas de las zonas destinatarias. La FIAR es eficaz durante 3 a 6 meses, dependiendo de los insecticidas utilizados y del tipo de superficie fumigada. En

algunos lugares, es preciso repetir la operación varias veces para proteger a la población durante toda la temporada de transmisión del paludismo. **(Organizacion Mundial de la Salud, 2017)**

2.2.3.3. Resistencia a los insecticidas

Gran parte del éxito obtenido hasta ahora en el control del paludismo se debe a la lucha anti vectorial, que depende en gran medida de la utilización de piretroides, la única clase de insecticidas recomendada en la actualidad para los mosquiteros tratados con insecticidas, incluidos los de acción prolongada. En los últimos años han aparecido mosquitos resistentes a los piretroides en muchos países. En algunas zonas se han detectado resistencias a las cuatro clases de insecticidas utilizadas en el ámbito de la salud pública. Afortunadamente, esta resistencia raramente ha reducido la eficacia de los mosquiteros tratados con insecticidas de acción prolongada, que siguen proporcionando un alto nivel de protección en casi todas las situaciones. En cuanto a la fumigación de interiores con insecticidas de acción residual, un método recomendado para evitar las resistencias es alternar el empleo de distintas clases de productos. **(Organizacion Mundial de la Salud, 2017)**

2.2.3.4. Incidencia de la Malaria en el Perú

La Malaria es un problema de salud pública de importancia mundial. Se considera que la malaria es una enfermedad prehistórica. Uno de los avances principales en la larga historia de la malaria, fue la contribución de la medicina peruana prehispánica a la terapéutica, a inicios del siglo XVII con el descubrimiento de la “corteza peruana” (quina), cuyo uso se diseminó rápidamente en Europa. Esta sustancia sigue siendo, aun en nuestros días, uno de los medicamentos principales para el tratamiento de los casos severos de malaria por *Plasmodium falciparum*. En los inicios del Programa Nacional de Erradicación de la Malaria (1957), el área malarígena alcanzaba el 75% del territorio nacional, incluyendo toda la selva alta y selva baja, los valles de la costa hasta los 2,000 msnm y los valles interandinos por debajo de los 2,300 msnm. Hacia 1968, el área infectada se redujo en un 86% y la población en riesgo de

adquirir la enfermedad se redujo en un 97%. Desde la ejecución del Programa Nacional de Erradicación de la Malaria, el 99% de los casos de malaria han sido debidos a *Plasmodium vivax*, el cual generalmente produce un cuadro benigno, lo que ha determinado en nuestro país la percepción de la malaria como un problema de poca gravedad. Esta fue favorecida en algunos casos por trastornos climáticos como el fenómeno del Niño, especialmente en la costa norte del país y por las migraciones. **(Legua, 2013)**

En la actualidad en la provincia de Lambayeque, no se ha presentado casos severos de Malaria, debido al control para evitar la propagación del vector con diversos programas, no obstante el riesgo es constante, donde se han presentado casos importados.

Según los datos mostrados por el Ministerio de Salud, el año 2017 se presentaron 2 casos en la región Lambayeque.

Mientras en el distrito de Motupe (área de estudio) conforme a los datos mostrados por la Gerencia Regional de Salud Lambayeque (GERESA) se observó un caso en el año 2016.

2.3. DEFINICION DE TERMINOS BASICOS.

Anopheles sp:

“Es un mosquito peligroso de apenas 1cm de largo habita en prácticamente todo el mundo incluyendo Europa, África, Asia, América y Oceanía, con especial intensidad en las zonas templadas, tropicales y subtropicales y su picadura es la causante de la malaria”. (Unicef, 2018).

Biocida:

“Los biocidas son sustancias activas o preparados que contienen una o más sustancias activas, presentados en la forma en que son suministrados al usuario, destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer el control de otro tipo sobre cualquier organismo nocivo”. (Zuño, 2012).

Bacillus sp:

“El género *Bacillus* comprende grandes bacilos aerobios Gram positivos que se organizan en cadenas. Son Bacilos de gran tamaño (4-10um), son formadores de esporas, la mayoría no causa enfermedad y son resistentes a condiciones desfavorables, en total existen 60 especies de bacilos entre las que más sobresalen son: *B. anthracis*, *B. Cereus*, *B. coagulans*, *B. Thuringiensis*. La mayor parte de los miembros de este género es saprofita y vive en la tierra, agua, aire, y en la vegetación. Algunos son patógenos para los insectos”. (Garcia, 2008)

Cepas:

“Cepa es un término que se acuña dentro de los campos de la microbiología. Son microorganismos del tipo fenotípico que representan una proporción derivada de un organismo mayor, como una muestra de estudio. Las cepas contienen información biológica que es de interés científico. Son obtenidas por lo general a través del procedimiento de la clonación”. (Zuño, 2012).

Control vectorial:

“Actividad por el cual se realizan acciones destinadas a eliminar una población de insectos vectores o controlar su población a niveles que no constituyan riesgo para la transmisión de enfermedades, sea control químico, físico o biológico”. **(MINSA, 2010)**

Controlador biológico:

“El Control Biológico en su definición más sencilla, es un método de control de plagas, enfermedades y malezas que consiste en utilizar organismos vivos con objeto de controlar las poblaciones de otro organismo. Es “la regulación de un organismo como consecuencia de la actividad de otro, lográndose con ello un equilibrio poblacional”. **(Corley & Villacide, 2012)**

Enfermedad metaxénicas:

“Son enfermedades transmisibles que ocurren cuando el agente biológico específico que produce las enfermedades transmitida al huésped humano por un portador animado no humano denominado vector”. **(Vasquez, 2015)**

Insecto Vector:

“Insecto es aquel que tiene la capacidad de adquirir un patógeno, permitir su propagación en su propio organismo y transmitirlo en forma viable a otro organismo que desarrollará la enfermedad”. **(Ministerio de Salud, 2008)**

Insecticida:

“Compuesto químico utilizado para matar insectos. Los insecticidas son utilizados para controlar plagas en la agricultura e insectos que afectan la salud humana y animal”. **(Ministerio de Salud, 2008)**

Larvas:

“Fase acuática (inmadura) de la metamorfosis del mosquito”. **(MINSA, 2010)**

Mosquito:

“Insecto perteneciente a la familia de los culicídeos; cuya hembra es hematófaga. También denominado zancudo”. **(MINSA, 2010)**

Plasmodium:

“Es un género de protistas del filo Apicomplexa, clase Aconoidasida, orden Haemosporida y familia *Plasmodiidae* del que se conocen más de 175 especies. El parásito siempre tiene dos huéspedes en su ciclo vital: un mosquito que actúa como vector y un huésped vertebrado. Al menos diez especies infectan al hombre. Para humanos hay cuatro especies de *Plasmodium* que provocan la malaria o paludismo: *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. vivax*, de las cuales la primera es la más virulenta y la que produce la mayor mortalidad”. (Nájera, Gonzáles, & Baratas, 2009).

Plaguicidas:

“Los plaguicidas son sustancias o mezcla que es usada para controlar las plagas que atacan los cultivos o los insectos que son vectores de enfermedades se clasifican en función de algunas de sus características principales, como son la toxicidad aguda, la vida media, la estructura química y su uso. En 1978, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció una clasificación basada en su peligrosidad o grado de toxicidad aguda, definida ésta como la capacidad del plaguicida de producir un daño agudo a la salud a través de una o múltiples exposiciones, en un período de tiempo relativamente”. (Flores, 2015)

Resistencia:

“Se describe como un cambio en la composición genética de una población, que se produce en respuesta a una presión selectiva debida a la aplicación de un tratamiento insecticida. Como resultado de ese cambio, el tratamiento insecticida deja de ser efectivo”. (MINSA, 2010)

2.4. HIPÓTESIS

Las cepas nativas de *Bacillus sp* tienen efecto biocida a concentraciones de 1.8×10^9 , 2.1×10^9 , 2.4×10^9 , 2.7×10^9 , 3.0×10^9 y tiempos de exposición de 24, 48 y 72 horas, sobre larvas de *Anopheles sp*.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. TIPO DE ESTUDIO Y DISEÑO DE INVESTIGACION

El presente trabajo tuvo un tipo de estudio experimental y diseño con estímulo creciente. Es una investigación experimental debido que se manipula las concentraciones para ver el efecto biocida de *Bacillus sp.* sobre las larvas de *Anopheles sp.* que se corroborara la información mediante bioensayos aplicados en el laboratorio en donde se evaluó la respuesta de la larva a la presión de la aplicación del biocida

El diseño de estímulo creciente consiste en tener grupos idénticos para la vigilancia, en este caso son las larvas de *Anopheles sp.* Las cuales estuvieron divididas en dos grupos: en el grupo control y el grupo experimental donde se le aplicara concentraciones de 1.8×10^9 , 2.1×10^9 , 2.4×10^9 , 2.7×10^9 , 3.0×10^9 con una observación de tiempos de exposición de 24, 48, 72 horas para determinar el porcentaje de mortalidad de larvas y la eficiencia del biocida.

3.2. POBLACION Y MUESTRA EN ESTUDIO

La población estuvo representada por todas las larvas de *Anopheles sp* que se recolectaron en los distintos cuerpos de agua estancada como drenes, arrozales, totoral, bordes de ríos, y lagunas temporales (charcos) en el distrito de Motupe, caserío El Salitral.

La muestra elegida fue de 200 larvas de *Anopheles sp* que estuvieron divididas en dos grupos de 100 y subdivididas en pequeños grupos de 20 en el cual se aplicó 3 repeticiones teniendo un total de 600 larvas; se eligió a criterio de las investigadoras encontradas en los antecedentes de (Ventura, 2004)

3.3. METODOS, TECNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCION DE DATOS.

3.3.1. Metodología para Aislamiento de *Bacillus sp*:

La Muestra que se eligió fue de 10g de fango del fondo de criaderos de *Anopheles sp. tipo* (total, arrozal, filtración, dren), Se Pesó 2 g de la muestra de fango y se realizaron diluciones seriadas en solución salina fisiológica estéril hasta 10^{-3} la cual se sometió la dilución 10^{-3} a tratamiento térmico de 80°C durante 10 minutos (baño maría) y luego se siguió con el enfriamiento rápido la disolución 10^{-3} se tomó una alícuota donde se sembró mediante la técnica de agotamiento y estría sobre la superficie de agar nutritivo (en las placas Petri), Seguido fue incubado en aerobiosis a 28°C durante 24 horas, Fueron Seleccionadas las colonias desarrolladas y se siguió con una tinción Gram para verificar la presencia de bacilos; se replicó las colonias seleccionadas hacia viales que contuvieron agar tripticasa soya (TSA) para obtener cultivos puros.

3.3.2. Selección de *Bacillus sp* en base a su potencial biocida frente a larvas de *Anopheles sp*.

Obtención de larvas *Anopheles sp*. para las pruebas de patogenicidad:

Seleccionaron los criaderos soleados con agua limpia y vegetación herbácea emergente, Seguido se continuo con la Realización de la recolección de larvas de *Anopheles sp*. mediante el “método de cucharón”, las cual se utilizó un cucharón blanco de mango largo que se sumerge con movimiento firme y en Angulo de 45° respecto a la superficie de agua para posteriormente extraerlo sin que rebose el agua .con un gotero plástico de boca ancha que recolectaron los estadios larvales de *Anopheles sp*. y transfirió a los recipientes con agua del mismo criadero donde en el laboratorio se mantuvo del mismo criadero de origen hasta su empleo en los ensayos de patogenicidad.

Pruebas de la suspensión bacteriana de *Bacillus sp*

a) Preparación de la suspensión bacteriana (esporas de *Bacillus sp*).

Se cultivó cada cepa de *Bacillus sp* sobre la superficie inclinada de agar tripticasa soya, se incubó en aerobiosis a 28°C durante 5 días seguido se verificó la esporulación a través de una tinción Gram la cual se realizó una suspensión celular en solución salina fisiológico y estandarizada con la concentración con el tubo 6, 7, 8, 9 y 10 del nefelómetro de McFarland (1.8×10^9 esporas y cristales /ml).

b) Efecto de *Bacillus sp.* sobre larvas de *Anopheles sp.*

Se depositó 10ml de cada una de las suspensiones bacterianas previamente estandarizadas sobre 90 ml de agua destilada estéril contenida en recipientes de vidrio de primer uso y con una capacidad de 250 ml. En cada recipiente se tuvo una concentración final de aproximadamente entre $1,8 \times 10^9$, $2,1 \times 10^9$, $2,4 \times 10^9$, $2,7 \times 10^9$, $3,0 \times 10^9$ esporas y cristales /ml, se colocó 20 larvas de *Anopheles sp.* (III estadio) la cual se condicionó un control positivo con 100 ml de agua destilada estéril y 20 larvas de *Anopheles sp.* estas larvas fueron alimentadas con comida para peces (para evitar el canibalismo) siguiendo se determinó la sobrevivencia de las larvas de *Anopheles sp.* después de 24, 48 y 72 horas de entrar en contacto con la suspensión de *Bacillus sp.* donde se consideró como larvas muertas aquellas que no reaccionan al ser tocadas en la región cefálica.

% Mortalidad

$$x = \frac{\% \text{ mortalidad expuestas} - \text{mortalidad del control negativo}}{100 - \% \text{ mortalidad del control negativo}} \times 100$$

Confirmación del efecto biocida de *Bacillus sp.*

De la cepa de *Bacillus sp.* se recuperó y cultivo en Agar Tripticasa Soya durante 5 días, se obtuvo una suspensión bacteriana a (esporas y cristales), estandarizar la concentraciones en el tubo 6 del nefelómetro de Mc Farland y se realizó un bioensayo con larvas de *Anopheles sp.*

Identificación de las especies de *Bacillus sp.*

Se caracterizó macroscópicamente la colonia donde fue: el color, tamaño, bordes, forma, elevación. Seguido de la caracterización microscópica de células: forma celular, reacción tintorial, presencia de espora y cristal. Para observar las esporas y cristales se realizó la coloración de verde malaquita modificada (realizar un frontis, cubrirlo con verde malaquita al 6%, calentar en el mechero por debajo de la lámina hasta que exista desprendimiento de vapores blancos por tres veces, dejando enfriar cada vez, enjuagar con agua corriente, cubrir el frontis con carbol fucsina al 0.1% durante 1 minuto, eliminar el exceso de colorante, enjuagar y dejar secar a medio ambiente). Siguiendo con las pruebas de mortalidad, hemolisis, hidrolisis de la gelatina, Voges Proskauer, rojo de metilo, Indol, Hidrolisis del almidón, utilización de carbohidratos glucosa, arabinosa, manitol.

Mantenimiento del *Bacillus sp.*

Se sembró cada una de las cepas *Bacillus sp.* controladas de *Anopheles sp.* En viales conteniendo Agar Tripticosa Soya, se incubó a 28°C durante 24 horas y se mantuvo en refrigeración. (Novoa & Pacherrres, 2003)

3.3.3. Instrumento

Se utilizó la observación porque aquí fue necesario visualizar todos los cambios que se dieron en cuanto el efecto biocida de las cepas nativas *Bacillus sp.* aisladas en humus sobre las larvas de *Anopheles sp.* y también se utilizó una lista de cotejo para anotar el control cuando ocurrieron estos cambios dentro de los tiempos de 24, 48, 72 horas.

3.4. PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANALISIS ESTADISTICOS.

Para el procesamiento de datos y análisis de la presente investigación se introdujo la información que se obtuvo de la observación y listas de cotejo al programa estadístico, tal como es el Excel, cual fueron usados los gráficos que sirvieron para expresar los resultados.

IV. RESULTADOS.

4.1. Aislamiento e identificación de cepas nativas de *Bacillus sp.* aisladas de Humus

Para el aislamiento del *Bacillus sp.*, se utilizó muestras de humus del fondo de criaderos de *Anopheles sp.*, para posteriormente ser diluido y poner las muestras en agar nutritivo incubadas en aerobiosis a 28°C durante 24 horas, se sembró mediante la técnica de agotamiento y estría sobre la superficie de agar nutritivo (en las placas Petri), las colonias fueron replicadas en Agar Tripticasa Soya (TSA) para la obtención de cultivos puros.



Figura 1: Se aisló la bacteria de *Bacillus sp.*

Para la identificación se realizaron pruebas bioquímicas convencionales y tinción Gram, para verificar la esporulación del Bacilo asimismo el resultado Gram positiva.



Figura 2: Se Identificó las colonias de cepas *Bacillus sp.*

4.2. Obtener e identificar larvas de *Anopheles sp.* en el distrito de Motupe

Las larvas de *Anopheles sp.* se obtuvieron en el caserío El Salitral-Motupe en criaderos soleados con agua limpia y vegetación emergente en brazos de ríos y aguas retenidas en donde se utilizó el método de cucharón las cuales fueron llevadas en recipientes con agua del mismo criadero, debidamente rotulado.

- a) Larvas del II estadio de *Anopheles sp.* siendo alimentadas con comida para peces esterilizada para evitar el canibalismo.
- b) Posición horizontal característica de la larva en el III estadio de *Anopheles sp.* en el agua.
- c) Larvas del III estadio, aisladas en agua estéril para la posterior aplicación del inóculo



Figura 3: Identificación de la larva de *Anopheles sp.*

Estas fueron identificadas de acuerdo a sus características físicas, las larvas del II y III estadio larval, poseen una cabeza desarrollada y prominente de

la que nacen una especie de bigotes que utilizan para alimentarse y el tórax y el abdomen (sin patas), los *Anopheles* fueron reconocidas por no disponer de un sifón respiratorio por lo que necesitan tener el cuerpo paralelo a la superficie del agua.

a y b) Vista microscópica de la cabeza y tórax; característica de las larvas *Anopheles* sp que carecen de patas.

c y d) Vista microscópica del abdomen; no tienen sifón respiratorio.

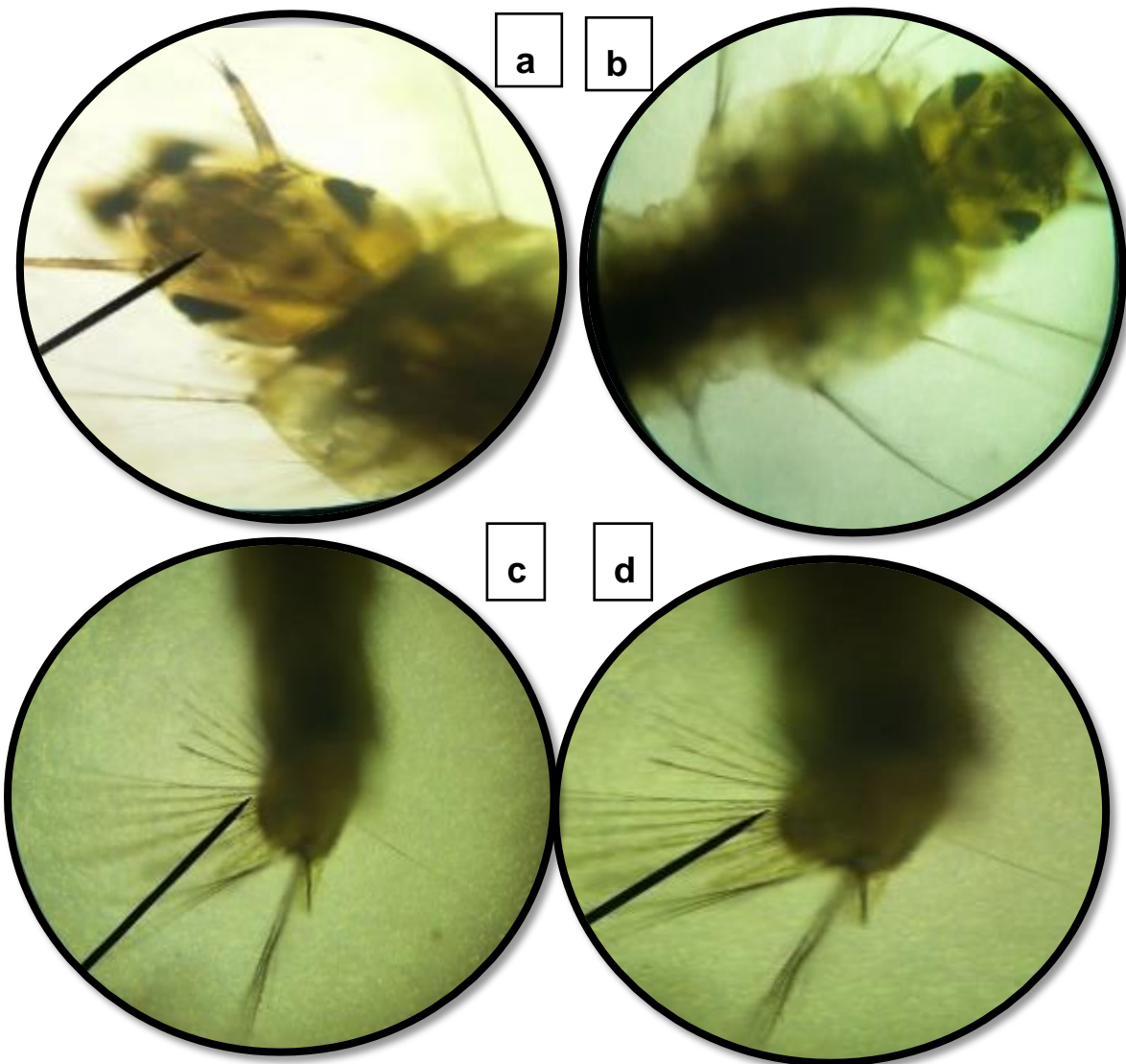


Figura 4: Larvas de *Anopheles* sp. observadas en el microscopio.

4.3. Evaluación de efecto biocida de las cepas nativas de *Bacillus* sp. sobre las larvas de *Anopheles* sp.

En la tabla 1 del grupo control se observó la muerte de 4 larvas a las 72 horas en las cuales no se les aplicó las concentraciones del biocida *Bacillus sphaericus*, el tubo 9 presentó 2 larvas muertas a las 72 horas a diferencia del tubo 6 y 10 donde no se encontró la muerte de ninguna de las larvas.

Tabla 1: Lista de cotejo del grupo control, que se usó para una comparación con el grupo experimental

GRUPO CONTROL: LARVAS DE <i>Anopheles</i> sp.				
CONCENTRACIONES	TIEMPO / HORAS			Total
	24	48	72	
{: TUBO 6	0	0	0	0
{: TUBO 7	0	0	1	1
{: TUBO 8	0	0	1	1
{: TUBO 9	0	0	2	2
{: TUBO 10	0	0	0	0
Total	0	0	4	4

FUENTE: Elaboración propia.

La tabla 2, presenta los cambios observados a las 24 horas con la muerte de 1 larva, luego de agregar el inóculo de la bacteria *Bacillus sphaericus*, por otra parte se pudo observar que a las 48 horas hubo una mortalidad creciente de 22 larvas y posteriormente a las 72 horas si hubo un efecto biocida más eficiente, representado por la muerte de 60 larvas de *Anopheles* sp. Finalmente de un total de 100 larvas se obtuvo la muerte de 83 de ellas las cuales fueron expuestas al inóculo de la bacteria en todo el tiempo de observación.

Tabla 2: Lista de cotejo del grupo experimental, donde se evaluó la mortalidad de las larvas de *Anopheles sp.* a diferentes concentraciones y tiempos de exposición

GRUPO EXPERIMENTAL: LARVAS DE <i>Anopheles sp.</i>				
CONCENTRACIONES	TIEMPO / HORAS			Total
	24	48	72	
{: TUBO 6 = (1.8x10 ⁹)	0	2	6	8
{: TUBO 7 = (2.1x10 ⁹)	0	4	12	16
{: TUBO 8 = (2.4x10 ⁹)	0	5	16	21
{: TUBO 9 = (2.7x10 ⁹)	0	5	12	17
{: TUBO 10 = (3.0x10 ⁹)	1	6	14	21
Total	1	22	60	83

FUENTE: Elaboración propia.

En la figura 2, se encontró que la concentración más efectiva del grupo experimental es la de 2.4x10⁹ del tubo 8, de esta manera el tubo 6 con concentración 1.8x10⁹ fue la menos eficaz con respecto al experimento que fueron expuestas hasta las 72 horas.

La fórmula para para calcular el porcentaje de mortalidad corregida es la siguiente:

% de Mortalidad Corregida

$$x = \frac{\% \text{ mortalidad expuestas} - \text{mortalidad del control negativo}}{100 - \% \text{ mortalidad del control negativo}} \times 100$$

$$\%M = x = \frac{83-4}{100-4} \times 100 = x = \frac{79}{96} \times 100 = 82$$

Obteniendo un resultado del 82% de eficiencia del biocida.

V. DISCUSION.

Respecto al uso de la bacteria de *Bacillus* sp. como controlador biológico, **Vargas (2010)** utilizó el *B. thuringiensis* como componente del larvicida asimismo utilizó 6 grupos experimentales y 1 grupo control dando como resultado una mortalidad del 20% a las 24, 55% a las 48 y 70% a las 72 horas; a diferencia de nuestro trabajo donde se usó el *B. sphaericus* como componente principal del biocida donde tuvo un 1 grupo control y 1 grupo experimental para cada repetición del bioensayo, donde se obtuvo como resultado del 64% en la primera fase, 68% en la segunda fase y 82% en la tercera fase, de mortalidad a las 72 horas.

De acuerdo con **William y Pinto (2012)** nos dice que las larvas de los Anofelinos, prefieren el tipo de cuerpo de agua adecuado para el desarrollo de larvas de mosquito hábitat o criadero varía entre especies e incluso dentro de la misma especie, las cuales prefieren cuerpos de agua sombreados o hábitats soleados, algunas especies de cuerpos de agua más permanentes como drenes, tanques, canales de riego por otro lado otras especies prefieren charcos temporales. Para obtener las muestras de larvas que se usaron para el presente trabajo de investigación, se muestrearon 2 tipos de criaderos naturales que son los charcos formados en los márgenes del río o pequeños brazos de agua que no tienen corriente o son más estables, y pequeños pozos formados por infiltración de agua subterránea, de igual manera 2 tipos de criaderos artificiales como arrozales y acequias que presentaron las características requeridas por las larvas de *Anopheles* sp, como son poco profundos, de agua limpia, vegetación flotante o abundante material orgánico como lo señala la **Dirección General de Salud Ambiental (2016)**

Finalmente **Ventura (2004)** recolecto muestras en el distrito de Olmos, Lambayeque, donde propuso Cultivar e inducir la síntesis de cristal de *Bacillus thuringiensis* H-14vas israelensis (Bti). En agar infusión de papa que permitió obtener la producción de Bti donde el estudio comprendió en trabajar con larvas del estadio II *Anopheles pseudopunctipennis* donde se utilizó cinco concentraciones de la bacteria (Bti) de 3×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3.7×10^7 , 1×10^8 esporas y cristales/mL, en cinco tiempos 2, 4, 8, 12 y 24 h, mostrando alta efectividad con la concentración de 1×10^8 a tiempos de exposición 24 horas en un 100% *Anopheles pseudopunctipennis*. A diferencia de nuestro trabajo se recolectaron larvas del distrito de Motupe, Lambayeque la cual utilizaron larvas III estadio donde se usó el *B. sphaericus* sin infusión como componente principal del biocida ha concentraciones 1.8×10^9 , 2.1×10^9 , 2.4×10^9 , 2.7×10^9 , 3.0×10^9 y tiempos de exposición de 24, 48, 72 horas con una efectividad de 82%, con la concentración de 2.4×10^9 mortalidad a las 72 horas.

Respecto a **Novoa & Pacherras (2003)** en el distrito de Sullana, Piura, donde se utilizó 20 muestras de fango de criaderos de *Anopheles spp*, las cuales fueron seleccionadas 6sa, 10Sa 30Mf, 43 Mf, 5 contendrían *Bacillus spp*, para determinar su patogenicidad sobre larvas del III estadio de *A. pseudopunctipennis* en condiciones a nivel de laboratorio, a concentraciones de 1.8×10^9 esporas y/o cristales/ml a tiempos de 24, 48, 72 h tuvo como resultados la mortalidad de larvas al 100% a las 72 h. a diferencia de las muestras para el aislamiento de *Bacillus sphaericus* de nuestro trabajo se recolectados de un solo lugar de los campos de cultivo del distrito de Motupe las cuales se utilizaron para diferentes concentraciones como 1.8×10^9 , 2.1×10^9 , 2.4×10^9 , 2.7×10^9 , 3.0×10^9 tiempos de exposición de 24, 48, 72 horas con una efectividad 82%, con la concentración de 2.4×10^9 mortalidad a las 72 horas.

VI. CONCLUSIONES

- 1- Se aisló el *Bacillus sp.* a partir de humus, además se obtuvo colonias de bacterias en donde se identificó la especie de *Bacillus sphaericus*, el cual se utilizó como componente para el inóculo del biocida.
- 2- En el distrito de Motupe hay presencia de larvas de *Anopheles sp.* que pueden convertirse en vectores para la transmisión de enfermedades metaxénicas como la Malaria o Paludismo, que representa un riesgo latente para la población.
- 3- Las cepas de *Bacillus sphaericus* tienen efecto biocida sobre larvas de *Anopheles sp.*, en donde se obtuvo mayor eficacia a una concentración de 2.4×10^9 y un tiempo de exposición de 72 horas, que representa un 82% de mortalidad.

VII. RECOMENDACIONES

- 1- El *Bacillus sp.* es una bacteria que tiene diversas propiedades, que se utilizan para realizar diversos procesos y además se encuentra en una variedad extensa de medios donde se pueden aislar, por eso deberían de elaborarse más investigaciones con el uso de estas bacterias como material biológico y menos contaminante para el ambiente.
- 2- Muchas poblaciones de especies han creado resistencia para los insecticidas, por eso se recomienda buscar nuevas medidas de control que no sean tan contaminantes como los plaguicidas, sobre los seres humanos y el ambiente
- 3- Se recomienda que se lleve a una observación mayor a 72 horas, ya que puede tener un efecto biocida más eficiente, que puede tener un 100 % de resultados positivos, además se deben realizar más investigaciones y realizar pruebas de campo.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Agencia para el Desarrollo Internacional de los Estados Unidos de América. (2012). Manual de Capacitación en Entomología de la Malaria. *Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional*, 15- 18.
- Castro, J. (2002). Eficacia de *Bacillus sphaericus* en criaderos naturales de mosquitos en zonas de alto riesgo de Malaria. En revista peruana de epidemiología. vol. 9, *En revista peruana de epidemiología*. Lima, Peru.
- Castro, J. (2015). Algunas Experiencias En El Control Biológico De Mosquitos Vectores, (Artículos De Revisión). *Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor De San Marcos*. Lima, Peru.
- Corley, J., & Villacide, J. (2012). *Manejo Integrado de Plagas Forestales*. Argentina: EEA INTA Bariloche.
- Cuervo, J. (2010). Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. *Tesis de grado, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia*. Bogota D.C., Colombia.
- Departamento de Entomología. (Agosto de 2013). Manual de Campo para la Vigilancia. Asuncion, Paraguay. Obtenido de http://www.paho.org/par/index.php?option=com_docman&view=download&alias=459-manual-de-campo-para-la-vigilancia-entomologica-de-anopheles&category_slug=epidemiologia-y-control-de-enfermedades&Itemid=253
- Dirección General de Salud Ambiental . (2010). *Norma Técnica de Salud para la Implementación de la Vigilancia y Control del Aedes aegypti, Vector del Dengue en el Territorio Nacional*. Lima. Lima: GASVER'G EDITORES SAC.
- Dirección General de Salud Ambiental. (21 de agosto de 2016). www.digesa.minsa.gob.pe. Recuperado el 30 de setiembre de 2016, de http://www.digesa.minsa.gob.pe/pw_vectores/anopheles01.htm
- EcuRed. (27 de noviembre de 2016). www.ecured.cu/EcuRed:Enciclopedia_cubana. Obtenido de <https://www.ecured.cu/Malaria>
- Flores, M. (MARZO de 2015). *Servicio Nacional de Sanidad Agraria*. Obtenido de Manejo Adecuado de los plaguicidas Químicos de uso Agrícola: http://minagri.gob.pe/portal/download/pdf/direccionesyoficinas/oficina_apoyo_enlace/manejo_de_plaguicidas_senasa.pdf
- Garcia, M. (25 de Febrero de 2008). *Compendio de microbiología médica*. Obtenido de <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:lyU6yv5IZL0J:https://carlaurrutia87.wordpress.com/2014/03/24/bacillus-anthraxis/+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=pe>
- Gómez, S., Hernández, C., & Corrales, L. (2009). *Bacillus sphaericus: Biocontrolador de vectores que producen malaria, fiebre amarilla y*

dengue. *Facultad de ciencias de la salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca*. Bogota D.C., Colombia.

- Gonzales, F. (2006). Control y efectos morfológicos de *Anopheles pseudopunctipennis*, theobald (díptera: culicidae) en estanques artificiales del campo agrícola experimental del Itesm, Apodaca, nuevo león. *Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Biológicas*. Nuevo Leon, Mexico.
- Huerta, D. (2013). Caracterización molecular de cepas de *Bacillus thuringiensis* con propiedades entomocidas, para vectores transmisores de enfermedades metaxénicas (dengue). *Tesis doctoral, FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS*. Lima, Peru.
- Lamothe, D., Hidalgo, Y., & Marquetti, M. (2017). Ensayo de campo con Bactivec® (*Bacillus thuringiensis*) y Griselesf® (*Bacillus sphaericus*) en sitios de cría de *Anopheles* sp. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, Vol 69, No 2.
- Legua, P. (2013). *Profesor Asociado del Departamento de Medicina*. Lima .
- Marquez, F. (2007). Aislamiento y taxonomía de bacterias del género *Bacillus* recolectadas en suelos de un bosque de *Pinus radiata* y una pradera permanente en distintas épocas de muestreo. *Tesis de grado, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile*. Valdivia, Chile.
- Ministerio de Salud. (Abril de 2008). Norma técnica de salud para la implementación del sistema de vigilancia de la resistencia de los vectores a los insecticidas de uso en salud pública. Lima, Lima, Perú.
- Ministerio del Ambiente. (2016). *Historia ambiental del Perú. Siglos XVIII y XIX*. Lima: Tarea Asociación Gráfica Educativa.
- MINSA. (2010). *Ministerio. (2010). Norma Técnica de Salud para la Implementación de la Vigilancia y Control del Aedes Aegypti, Vector del Dengue en el Territorio Nacional RM N° 797-2010/MINSA*. Lima : AYMA CONSORCIO SAC.
- Nájera, J., Gonzáles, A., & Baratas, A. (2009). *Guía didáctica de la exposición: Malaria*. España: Biblioteca Nacional de España.
- Novoa, N., & Pacherrres, H. (2003). Cepas Nativas de *Bacillus* spp. como potenciales controladores de larvas de *Anopheles pseudopunctipennis* Sullana enero – setiembre 2001. *Tesis de grado, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Pedro Ruiz Gallo*. Lambayeque, Peru.
- Organizacion Mundial de la Salud. (junio de 2017). *OMS | Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de http://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/chemical_control/es/
- Rivas, J., & Zamora, P. (2014). *Evaluación del efecto del periodo de seca sobre la poblacion de vectores de Malaria*. Chiclayo.
- Sánchez, J., Correa, M., & Castañeda, L. (2014). *Bacillus cereus un patógeno importante en el control microbiológico de los alimentos. Universidad de Antioquia*. Medellin , Colombia.

- Unicef. (9 de Febrero de 2018). *Los mosquitos de Anopheles* . Obtenido de <http://www.paludismo.org/mosquitos-anopheles/>
- Vargas, F. (2002). Estandarización de un medio de cultivo para la producción masiva de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. utilizando *Aspargus officinalis*. v *congreso de parasitología*, pp 128, *universidad nacional*. Trujillo, Peru.
- Vargas, F., Roldan, J., Zavaleta, G., Ampuero, C., Burga, A., Moreno, B., Ventosilla, P. (2002). Efectividad biolarvica de *Bacillus thuringiensis* H-14.israelensis sobre *Anopheles* sp. en criaderos naturales. *Libro de resúmenes congreso peruano de parasitología*, pp 127 *universidad nacional trujillo*. Trujillo, Peru.
- Vargas, M. (2010). Utilización del desecho pesquero zanguaza en la producción de Bioinsecticida por *Bacillus thuringiensis* sobre las larvas de *Anopheles* sp. *Laboratorio de biotecnología, Facultad de ciencias biológicas – universidad naciona de trujillo*. Trujillo, PERU.
- Vasquez, M. (21 de OCTUBRE de 2015). *Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores*. Obtenido de CIENCIA TECNOLOGIA Y AMBIENTE: <http://juanecasa.blogspot.pe/2015/10/enfermedades-metaxenicas.html>
- Ventura, R. (2004). Efecto biolarvica in vitro de *Bacillus thuringiensis* H-14VAR.israelensis cultivado en agar infusión de papa sobre *Aedes aegypti* y *Anopheles pseudopunctipennis*. *Tesis de grado, Facultad de ciencias Biológicas, universidad nacional*. Lambayeque, Peru.
- Zavaleta, G. (2000). Efecto de *Bacillus thurigiensis* H-14 variedad israelensis sobre la supervivencia de los estadios larvales de *Anopheles pseudopunctipennis* y *Anopheles calderoni* encondiciones de laboratorio. *acultad de ciencias biológicas ,tesis .Msc Microbiologo universidad nacional de Trujillo*. Trujillo, Peru.
- Zavaleta, G. (2010). Evaluación de la capacidad biocida de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. Israelensis cultivado en sanguaza sobre larvas DE *Aedes aegypti*. . *Escuela de posgrado, tesis para optar grado doctor en ciencias biológicas, universidad nacional de Trujillo*. Libertad, Trujillo, Peru.
- Zuño, E. (24 de febrero de 2012). *BIOCIDAS*. Obtenido de BIOCIDAS: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:-0pCqG6a4ZIJ:www.ub.edu/hlg/CD/biocidas.htm+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=pe>

IX. ANEXOS

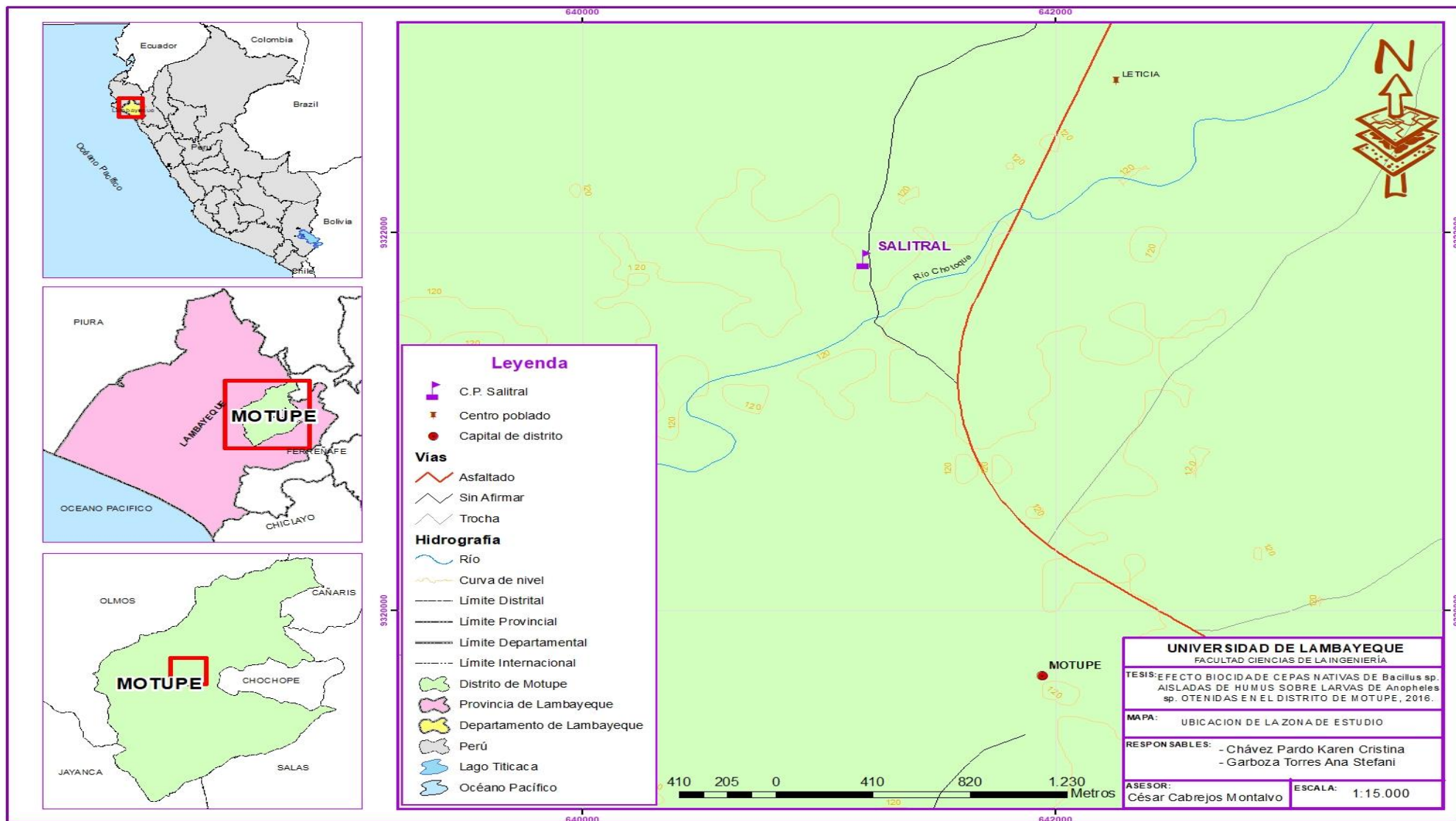


Figura 5: Mapa de ubicación del caserío El Salitral, distrito de Motupe, Provincia de Lambayeque, departamento de Lambayeque, lugar donde se obtuvo las muestras de larvas de II estadio.

- a) Criadero de *Anopheles sp* tipo totoral.
- b) Criadero de *Anopheles sp* tipo arrozal.
- c) criadero de *Anopheles sp*. tipo filtración.
- d) Criadero de *Anopheles sp*. aguas estancadas con vegetación.
- e) Criadero de *Anopheles sp*. en brazos de arroyos con abundante flora acuática.

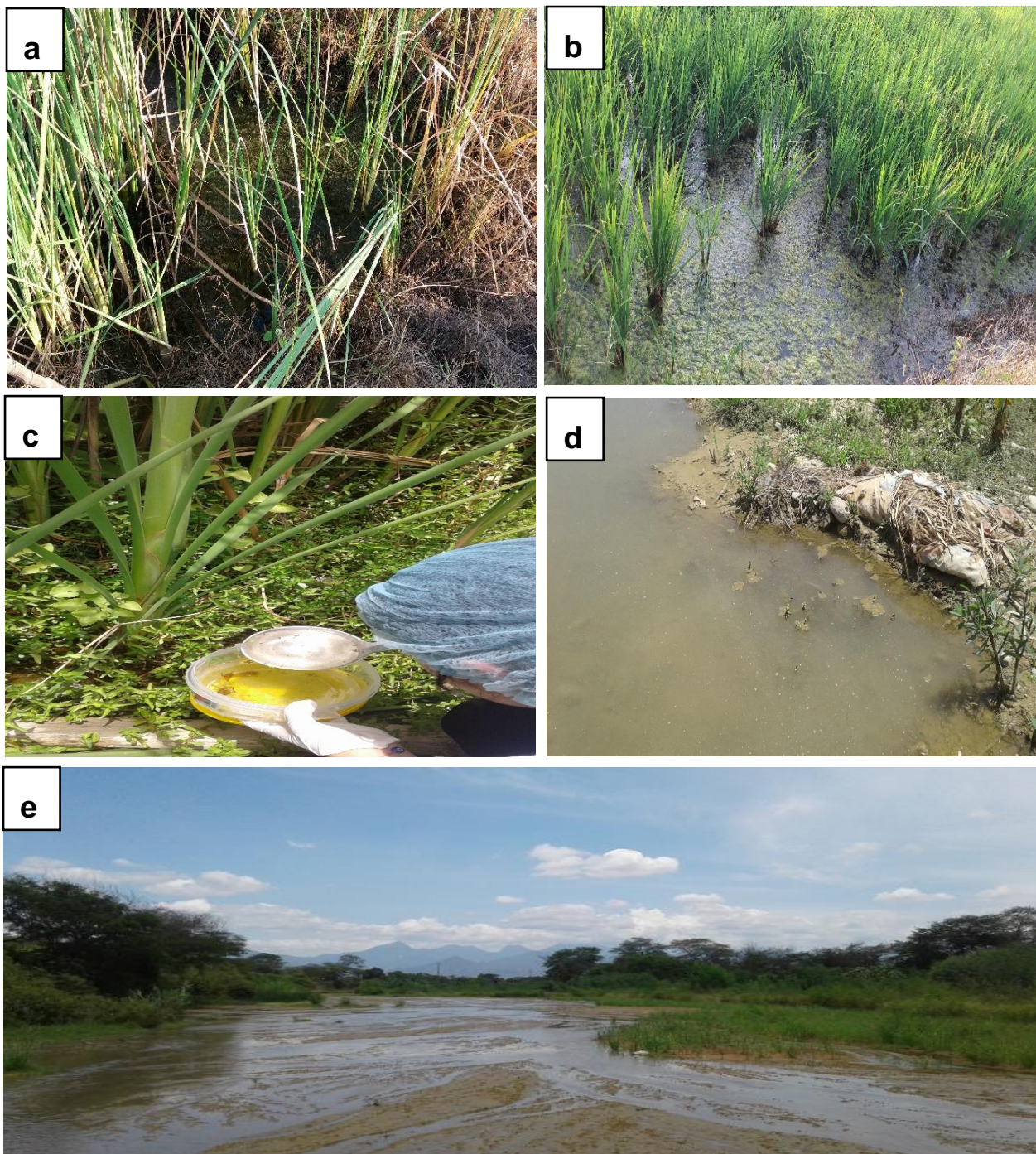


Figura 6: Criaderos de larvas de *Anopheles sp*.

a y b) Recolección de larvas de *Anopheles sp* con el método del cucharón para luego ser almacenadas en el depósito con la misma agua del criadero.

c y d) Se sumergió el cucharón con movimiento firme y en Angulo de 45° respecto a la superficie de agua para posteriormente extraerlo sin que rebose el agua.



Figura 7: Recolección de muestras de *Anopheles sp*.

a) Material para la preparación de las concentraciones con caldo peptonado con la cepas de *Bacillus* sp.

b y c) Preparación del inóculo aplicando el método de McFarland en concentraciones de $1,8 \times 10^9$, $2,1 \times 10^9$, $2,4 \times 10^9$, $2,7 \times 10^9$, $3,0 \times 10^9$



Figura 8: Aplicación de las cepas de *Bacillus* sp. en caldo peptonado, formando el inóculo que posteriormente se aplicó a las muestras de larvas de *Anopheles* sp.



Figura 9: Aplicación del inoculo a las larvas de *Anopheles* sp.

Muestras de 20 larvas en el III estadio, en cada depósito para su posterior aplicación de concentraciones.

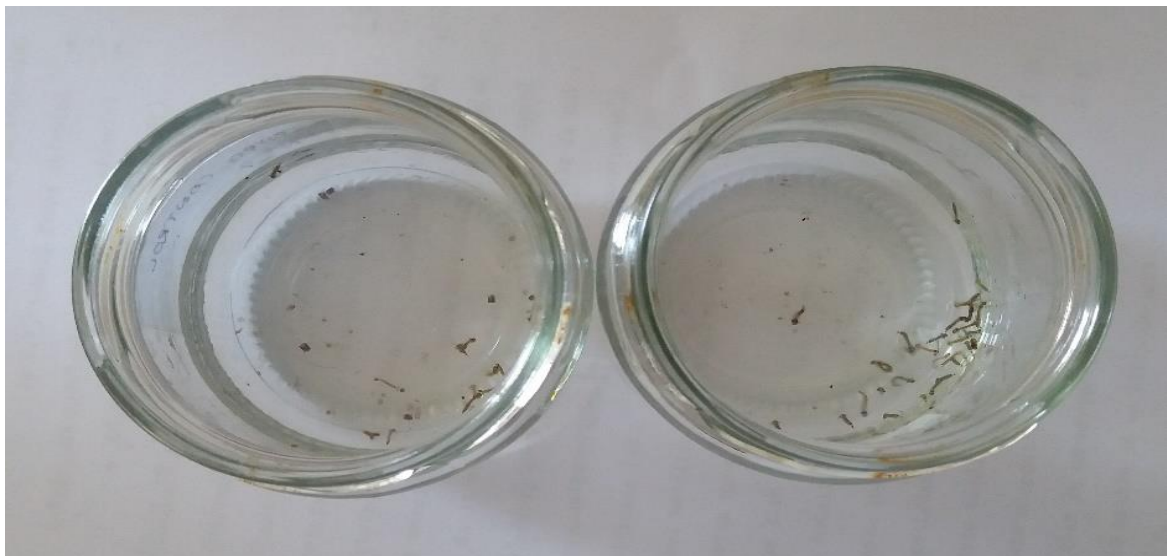


Figura 10: Muestras de larvas de *Anopheles* sp.

Muestras de las larvas *Anopheles* en el grupo control y experimental con las concentraciones aplicadas $1,8 \times 10^9$, $2,1 \times 10^9$, $2,4 \times 10^9$, $2,7 \times 10^9$, $3,0 \times 10^9$ para luego evaluar la mortalidad a las 24, 48, 72 horas.

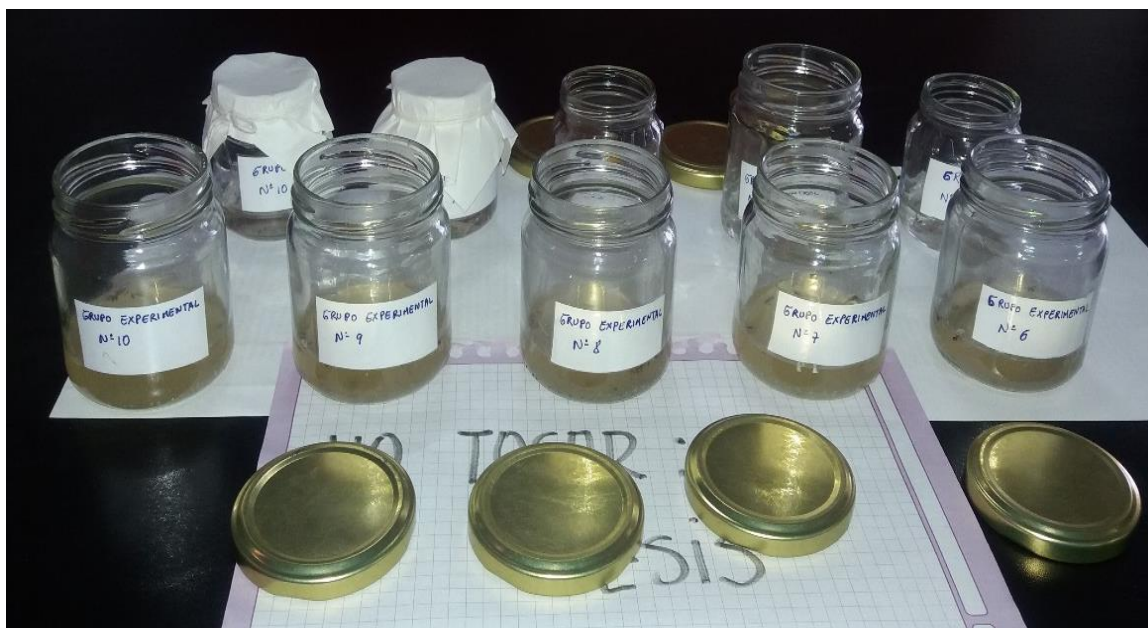


Figura 11: Bioensayos

Tabla 3: Formato de la lista de cotejo usada para apuntar la mortalidad de las larvas de *Anopheles* en los diferentes tiempos de 24, 48, 72 horas .

GRUPO: LARVAS DE <i>Anopheles</i> sp.				
CONCENTRACIONES	TIEMPO / HORAS			Total
	24	48	72	
{ } : TUBO 6	0	0	0	0
{ } : TUBO 7	0	0	0	0
{ } : TUBO 8	0	0	0	0
{ } : TUBO 9	0	0	0	0
{ } : TUBO 10	0	0	0	0
Total	0	0	0	0

Fuente: Elaboración propia

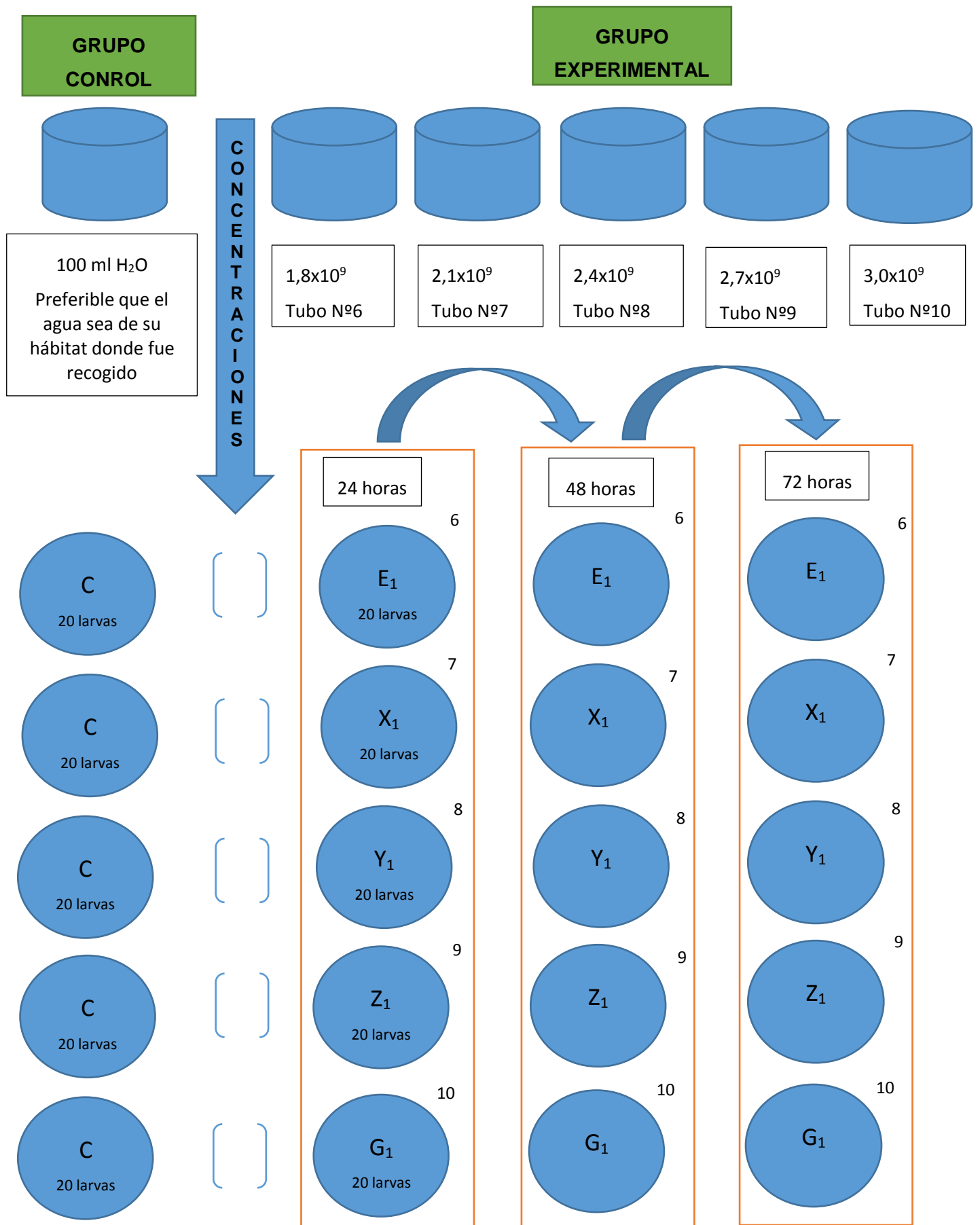


Figura 12: Esquema de la contrastación de hipótesis

Mapa de incidencia de malaria total por distritos Perú 2017*



Figura 13: Incidencia de la Malaria por departamentos en el Perú

Tabla 4: Casos de Malaria (Vivax +Falciparum) según departamentos Perú años 2004 – 2016 y 2017.

DEPARTAMENTOS	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017*
LORETO	42974	54286	42467	37008	25054	25850	11446	11779	25148	43701	61092	60268	54007	917
JUNIN	6382	5757	2912	3424	2508	1948	7289	4586	1840	2217	2060	1104	663	20
MADRE DE DIOS	2193	5283	4878	4605	4489	2140	3041	1760	665	260	12	10	6	0
SAN MARTIN	10544	4911	1538	985	854	848	748	252	164	105	769	577	421	15
AYACUCHO	4742	5204	2740	892	412	423	1090	2226	2523	1604	682	97	50	2
CUSCO	4760	3410	1742	704	611	295	1038	1066	450	685	365	146	158	18
PIURA	777	319	174	588	4016	2721	2153	251	25	16	9	5	1	0
TUMBES	1066	437	453	1167	2793	1474	1813	684	87	0	2	0	2	0
UCAYALI	3541	2685	636	144	294	229	256	57	48	96	62	136	89	3
AMAZONAS	930	1380	344	517	181	84	7	8	1	3	123	733	348	5
LA LIBERTAD	1115	740	1151	254	125	248	172	237	105	82	49	49	131	2
CAJAMARCA	983	1164	546	288	106	56	25	69	35	11	1	19	18	0
PASCO	306	518	354	212	221	24	157	50	601	39	8	8	3	0
ANCASH	627	628	638	244	1	16	2	0	2	0	0	0	0	0
LAMBAYEQUE	213	362	36	123	131	344	89	24	5	8	5	0	2	0
APURIMAC	340	446	10	8	1	10	4	5	3	2	0	0	1	0
HUANCAVELICA	114	59	96	56	20	3	5	2	0	2	0	0	0	0
HUANUCO	154	75	12	5	1	3	4	4	2	6	0	1	1	0
PUNO	5	5	4	5	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0
LIMA	0	4	4	3	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0
ICA	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AREQUIPA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
CALLAO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MOQUEGUA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total general	81766	87673	60737	51234	41821	36716	29339	23060	31704	48839	65239	63153	55904	982

Fuente: Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades – MINSA.

Tabla 5: Incidencia de Malaria en los distritos del departamento de Lambayeque

DIAGNOSTICOS	MALARIA POR P. VIVAX					
	AÑO					
DISTRITO	2011	2012	2013	2014	2016	Total General
CHOCHOPE	4		3			7
CHONGOYAPE	1					1
JAYANCA		1				1
MOTUPE	4	3	1	2	1	11
OLMOS	1					1
SALAS	11		4	2		17
CAÑARIS	3	1				4
Total General	24	5	8	4	1	42

FUENTE: Elaborado por la Gerencia Regional de Salud Lambayeque – GERESA 2011- 2016.